

## Actin 重合に及ぼす Myosin-B の影響

遠藤 邦夫 池田 洋二 佐藤 祥一

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

### Effect of Myosin-B on the Polymerization of Actin

By

KUNIO ENDŌ, YŌJI IKEDA and SHŌICHI SATŌ

Department of Physiology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. T. NAGAI)

A. Szent-Györgyi<sup>3)</sup> showed that myosin (a combined product of H and L-meromyosin) had a catalytic effect on the polymerization of G-actin, and suggested that actomyosin had no catalytic effect.

In the previous paper<sup>1),2)</sup>, however, the native myosin shows a catalytic effect on the actin polymerization, and actomyosin seemed to show a catalytic effect on the actin polymerization.

Therefore, in order to determine whether the actomyosin had a catalytic action on actin polymerization, the experiments presented in this paper were performed using myosin-B.

Results obtained were as follows:

1) Myosin-B shows a catalytic effect on the polymerization of G-actin (Fig. 1), and its catalytic effect seems to be related to its concentration, only within the range of slight amounts (Fig. 3).

2) The F-actin have no catalytic effect (Fig. 2).

3) This catalytic effect seems to be attributed to actomyosin itself and not to the action of impurities (inorganic salts etc.) or the free myosin in myosin-B sample (Fig. 2).

From the above mentioned results, the authors concluded that actomyosin has a catalytic action on the actin polymerization and the catalytic action of actomyosin is held by the part of myosin of the actomyosin molecule exclusive of the part of actomyosin bonding.

著者の一人は別報<sup>1),2)</sup>で actin 重合に及ぼす myosin (以下 M-A と記す) の影響を詳細に観察し、M-A が actin 重合に対しその速度を促進することを確めた。しかし、かかる効果は熱変性 M-A では認められなかつた。このような事実に基づき M-A の効果は M-A に含まれる無機塩によるものでないことは確かであり、M-A 蛋白自体の一種の catalytic effect と考えるのが妥当であると報告した。

しかしながら、かかる catalytic effect は M-A の如何なる作用に基づくものであるか、この点に関する報告は極めて少なく未だ明らかにされていない。A. Szent-Györgyi<sup>3)</sup>によれば、H-meromyosin は actin と結合するがその重合を catalyse せず、L-meromyosin は双方の効果を共に有しないから M-A としての構造を持つてはじめて actin の重合を促進出来るという。氏はさらに、かかる M-A の重合促進効果はその濃度に依存するが故に M-A はそれに equivalent の actin のみを促進すると述べている。このことは M-A という高 level になつてはじめて catalytic effect を持つこと、さらに M-A はこれと stoichiometric

に結合する actin のみを重合せしめ、actomyosin (以下 AM と記す) は catalytic effect を持たないことを示唆する。

しかるに、上記別報<sup>1),2)</sup>の成績は AM もまた G-actin に対し catalytic effect を有することを示唆している。そこで、われわれは F-actin と M-A とが stoichiometric ratio を以て結合しているとされている myosin-B (以下 M-B と記す) を用いて G-actin 重合に対する catalytic effect の有無を詳細に検討すべく以下述べる如き実験を行つた。

#### 実験材料並びに実験方法

##### A. 実験材料 (stock solution):

G-actin 溶液: 別報に同じ。3.89~11.36 mg prot./ml のもの。

F-actin 溶液: 上記 G-actin を 0.1 M KCl 溶液となし重合させた 1.136 mg prot./ml のもの。

M-A 溶液: 別報<sup>1)</sup>に同じ。4.2~18.8 mg prot./ml のもの。

M-B 溶液: Szent-Györgyi<sup>(1)</sup> 氏法に従つて調製し Edsall<sup>(2)</sup> の法により 3 回洗滌したもので 6.5~18.8 mg/ml の protein を含む。その他 sample の蛋白濃度の定量, KCl 溶液, 水等は総て別報<sup>(1,2)</sup> に準じた。

#### B. 実験方法:

i) 粘度測定方法: 反応混液の総量を 6.0 ml または 7.0 ml (粘度計の容量による) とし Ostwald 型粘度計を用いて測定した (粘度値の表示は別報<sup>(1,2)</sup> に準じた)。各溶液を加える順序は別報と同じであるが, M-B-F-actin 混液を添加する場合には予め時々振盪を加え, その混液の粘度が安定した後 (約 30 分後) に実験に供した。

なお, 本論文で示した成績は総て 0.4 M KCl 環境で行つたものである。また測定温度は 20°C または 25°C とした。

ii) catalytic effect の判定: 別報に従つて M-A または M-B が G-actin の重合に伴う粘度—時間曲線の最高粘度値に達する時間 (以下 Maximum time と記す) を短縮する効果を以て判定した。

#### 実験成績

1) G-actin に少量の M-B 及び終濃度が 0.4 M になる如く KCl 溶液を加えて重合を開始させ, その混液の粘度変

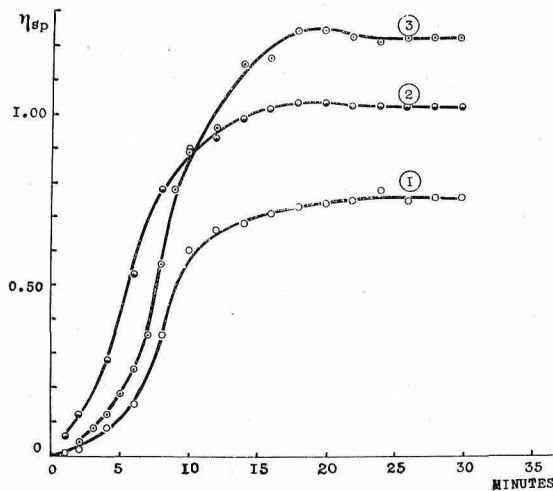


Fig. 1. Effect of myosin-B on actin polymerization.

[KCl]: 0.4 M (final concentration).

Reaction mixture: 7.0 ml (total volume).

Temperature: 25°C.

- ① G-actin, 2.035 mg/ml (final concentration) in 0.4 M KCl solution.
- ② G-actin, 2.035 mg/ml plus myosin-B, 0.136 mg/ml (final concentration).
- ③ G-actin, 2.035 mg/ml plus myosin-A, 0.134 mg/ml (final concentration).

化を追跡した。また, 対照として G-actin に対し前記 M-B の代りにこれとほぼ等量 (蛋白濃度) の M-A を加えた場合の粘度変化を観察し Fig. 1 の如き結果を得た。

これによれば, G-actin-M-B 混液の粘度—時間曲線 (curve ②) の上昇勾配, 最高並びに最終粘度値は actin 単独の重合曲線 (curve ①) を遙かに上廻り, またその curve ② の Maximum time は G-actin-M-A 混液の粘度曲線 (curve ③) のそれと一致し 20 分であり, curve ① の Maximum time より 4 分短縮された。また, curve ② は curve ③ よりも立上りがやや早いにもかかわらず最高及び最終粘度値は curve ③ を下廻る値を示した。

2) 前項と同じ要領で G-actin の重合に及ぼす少量の M-B, F-actin 及び M-B-F-actin 混液の影響を粘度的に比較して Fig. 2 の如き成績を得た。

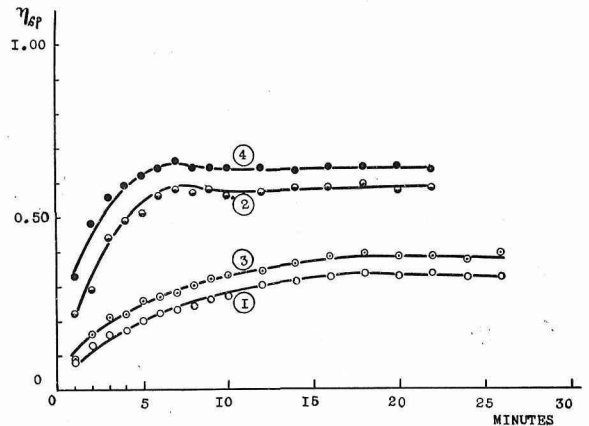


Fig. 2. Effect of F-actin and myosin-B on actin polymerization.

[KCl]: 0.4 M (final concentration).

Reaction mixture: 6.0 ml (total volume).

Temperature: 20°C.

- ① G-actin, 1.89 mg/ml (final concentration) in 0.4 M KCl.
- ② G-actin, 1.89 mg/ml plus myosin-B, 0.5 mg/ml (final concentration).
- ③ G-actin, 1.89 mg/ml plus F-actin, 0.047 mg/ml (final concentration).
- ④ G-actin, 1.89 mg/ml plus mixed solution of F-actin, 0.047 mg/ml and myosin-B, 0.5 mg/ml (final concentration).

即ち, G-actin と少量の F-actin との混液の粘度曲線 (curve ③) は全般的に actin 単独の重合曲線 (curve ①) を僅かに上廻るのみで, 両曲線はほぼ同様の経過を辿りそれぞれ 18 分で最高粘度値に達した。また, M-B-F-actin 混液を G-actin に加えて得た curve ④ もまた G-actin-M-B 混液の粘度曲線 (curve ②) を僅かに上廻る値を示し,

これら curve ② と ④ の Maximum time は 7 分で全く一致し前記 curve ① のそれより 11 分短縮されている。なお、curve ① と ③ とにおいて見られる粘度差は curve ②, ④ 間の差とほぼ等しい値を示した。

3) G-actin 量を一定 (1.667 mg prot./mℓ) とし、前項と同じ要領でこれに加える M-B 量を変化させ Fig. 3 に見る如き結果を得た。なお、参考の意味で G-actin に対しその約 1/11.6 量 (0.143 mg prot./mℓ) の M-A を加えた場合の成績を curve ⑥ として示した。

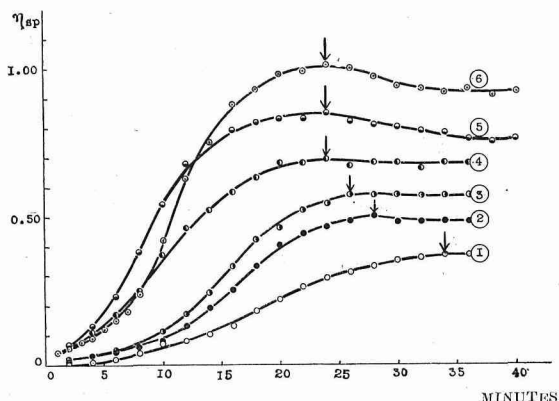


Fig. 3. Effect of myosin-B concentration on actin polymerization.

[KCl]: 0.4 M (final concentration).

Reaction mixture: 7.0 mℓ (total volume).

Temperature: 25°C.

- ① G-actin, 1.667 mg/mℓ (final concentration) in 0.4 M KCl solution.
  - ② G-actin, 1.667 mg/mℓ plus myosin-B, 0.0143 mg/mℓ (final concentration).
  - ⊖—⊖ ③ G-actin, 1.667 mg/mℓ plus myosin-B, 0.0357 mg/mℓ (final concentration).
  - ⊕—⊕ ④ G-actin, 1.667 mg/mℓ plus myosin-B, 0.0714 mg/mℓ (final concentration).
  - ⊗—⊗ ⑤ G-actin, 1.667 mg/mℓ plus myosin-B, 0.143 mg/mℓ (final concentration).
  - ⊙—⊙ ⑥ G-actin, 1.667 mg/mℓ plus myosin-A, 0.143 mg/mℓ (final concentration).
- ↓ : Maximum viscosity.

これによれば、G-actin に対しその約 1/11.6 量 (0.143 mg prot./mℓ) 或は約 1/23 量 (0.0714 mg prot./mℓ) の M-B を加えた場合 (curve ⑤, ④) はそれら混液の粘度—時間曲線の Maximum time は何れも 24 分で、G-actin-M-A 混液の粘度—時間曲線 (curve ⑥) のそれと一致した。これに反し、G-actin に対し約 1/47 量 0.0357 mg prot./mℓ の M-B を加えた curve ③ は 26 分、約 1/116 量 (0.0143 mg prot./mℓ) の M-B を添加した curve ② は 28 分でそれぞれその最高粘度値に達し、M-B 量が減少する

に従つて Maximum time の短縮割合が少なくなり actin 単独の重合曲線 (curve ①) の maximum time (32 分) に近接する傾向が見られた。

### 総括並びに考按

以上の成績を要約すれば次の如くなる。即ち、1) M-B は 0.4 M KCl における G-actin の重合に対し M-A と同様 catalytic effect を示している。しかし、M-A 添加の場合に比しその粘度—時間曲線の立上りがやや早いにもかかわらず最高並びに最終粘度値が低い (Fig. 1, 3)。2) F-actin は G-actin の重合に対して影響を与えず、また、M-B の G-actin 重合に対する効果に対しても影響を及ぼしていない (Fig. 2)。3) catalytic effect と M-B 濃度との関係については、M-B が G-actin に対して 1/47 量以下の微量の場合には M-B 濃度が減少するとともに G-actin 重合に対する catalytic effect も減弱し、G-actin 単独の重合曲線の Maximum time に近接する (Fig. 3)。

上記の成績に基づき 2, 3 の考察を試みる。

#### 1) Actin 重合に及ぼす M-B の影響についての分析

従来、actin 重合に対する M-A の catalytic effect については Laki<sup>1)</sup>, A. Szent-Györgyi<sup>2)</sup> 及び遠藤<sup>1),2)</sup> の報告があるに過ぎず、M-B の効果に関しては全く報告を見ない。A. Szent-Györgyi<sup>2)</sup> は前述の如く、M-A の効果が M-A に equivalent の G-actin だけを促進するに止まるからこれは真の意味の catalytic effect でないという見解を採っている。従つて、このことは AM は actin の重合に対し catalytic effect を有しないことを意味している。しかるに、遠藤は別報<sup>1),2)</sup> で上記 A. Szent-Györgyi の見解を支持することが出来ず、単なる catalytic effect と見做すべきであると述べた。また、本報の成績 (Fig. 1) も用いた M-B sample が一応 catalytic effect を持つことを意味していると解すべきである。

しかし、この M-B sample を加えて G-actin の重合が促進された因子としては AM が catalytic effect を持たなくても、なお、a) M-B に含まれている無機塩、または M-A 以外の蛋白質等の夾雑物、b) 遊離状態にある M-A の混在が考えられる。これらにつき 2, 3 論議する。

a) M-B 中の夾雑物について：M-B に含まれ actin の重合に対し catalytic effect を表わし得る夾雑物としては  $Mg^{++}$  が先ず考えられる。NaCl と少量の  $Mg^{++}$  が共存すると actin の重合速度は促進され、しかも  $Mg$  濃度に比例するという<sup>7)</sup>。また、筋肉中には極く少量ではあるが actin に類似した性質を有する tropomyosin がある<sup>8)</sup>。故に、これらの夾雑物によつて actin の重合が促進される可能性が考えられる。しかし、Fig. 3, curve ② では加え

た M-B が極く少量 (0.0143 mg/ml) であるから、この M-B 中の無機塩<sup>\*</sup>、或は tropomyosin は極端に少ない筈である。それにもかかわらず、明らかに actin の重合が促進されている。かかる事実は  $Mg^{++}$  或は tropomyosin 等の作用のみでは説明することが困難である、即ち、M-B 中の上記の如き夾雑物の存在は否定し得ないとしても、これらのものが actin の重合促進効果に関して主導的役割を演ずるものではないであろう。

b) M-B 中の free M-A について：従来、M-B は F-actin と M-A とが一定の割合で結合した蛋白質であることは一般に認められている。その F-actin と M-A との結合量比について多くの報告<sup>9), 10-12)</sup> があるが、何れにしても F-actin 比較的に少なく M-A が多い比率で過不足なく結合している状態であると考えられている。しかしながら、M-B sample 中になお、actin と結合していない M-A が存在するならば、AM が catalytic effect を持たなくても actin の重合はこの free M-A によつて促進される可能性がある。この種 M-A の量は存在するとしても極く少量であると考えられるが、Csápo<sup>13)</sup> によれば AM sample の約 40% を占めるという。勿論、彼のいう AM と本実験において使用せる M-B とは同列に論ずることは出来ないし、また彼の AM 定量法についても疑義<sup>14)</sup> がある。しかし、今仮に多く見積り、彼に従つて約 40% の free M-A が混在するものとして、上記問題につき検討を加えたのが Fig. 2 である。上記 Csápo の % によつて計算すると、この図において加えた M-B (0.5 mg prot./ml) の中 0.2 mg prot./ml が free M-A であることになる。この free M-A を総て AM とするためには AM の stoichiometric ratio を F-actin : M-A = 1 : 5<sup>3)</sup> とすると、追加すべき F-actin は 0.04 mg/ml となる。従つて、0.047 mg/ml の F-actin を予め M-B に加えた F-actin-M-B 混液中には AM のみ (勿論もし有りとすれば余剰の free F-actin もそれに加えて存在する) が存在すると考えられる。

さて、curve ① と curve ② より M-A を含むと一応考えられる M-B 溶液は図の如く明らかに catalytic effect を示している。しかし Csápo の議論に従つて作った、少なくとも free M-A の総てが AM 化された F-actin-M-B 混液は curve ①、curve ④ から catalytic effect を持つことが明らかにわかる。しかし、curve ①、curve ③ の粘度差よりも curve ④、② 間の粘度差が僅か大なるのみではば等しいから用いた M-B sample 中に含まれる free M-A は極く僅かであり、従つて上記 F-actin-M-B 混液には AM の他に余分の F-actin があることは確かである。しかし、curve ①、③ より F-actin は catalytic

effect がないことは明らかであるから curve ④ に示される catalytic effect は完全に AM のみのものであると結論される。

以上種々論じて来たが、結局、Fig. 1 に見られた M-B の catalytic effect は M-B sample 中に混在する無機塩その他の夾雑物が、或はまた上述の如く M-B sample 中の free M-A が actin 重合に対し catalytic effect を現わす決定的要素でなく、AM 自体が何等かの catalytic effect を有するものと考えなければならない。従つて、AM の catalytic effect について、むしろこれを否定した A. Szent-Györgyi<sup>15)</sup> の見解の妥当性を失わしめるであろう。しかし、このような効果をもたらすその機構は不明であるが、その行われる AM 分子の部位については、AM 結合の結合部はその結合によつて総て除外されており、従つてその部を除いた他の AM 部分であることは明らかであり、さらに F-actin は catalytic effect を持たない点から考えて AM 分子の中 M-A 部分がその作用を持つと考えられる。

## 2) M-A, M-B の actin 重合に及ぼす catalytic effect の比較

遠藤は先<sup>1), 2)</sup> に、G-actin に対しその 1/2~1/32 量までの M-A を加えた場合にその促進効果が M-A 量と無関係に一定である (以下この域を『濃度と無関係の域』と記す) と報告した。しかし、その際 1/32 量以下の極く微量の M-A ではこの促進効果が M-A 量に依存する (以下この域を『濃度に依存する域』と記す) と考えられると述べた。

しかし、Fig. 3 に見る如く、curve ④ 及び ⑤ における Maximum time は M-A を加えた curve ⑥ のそれと一致しているが、それ以下の微量の M-B を加えた curve ③、② では M-B 量が減少するに従つて Maximum time が延長し control の curve ① のそれに近接する傾向が認められる。

従つて、以上の如き蛋白濃度についての効果の類似性から actin の重合に対して M-A、M-B が持つ catalytic effect の機構は両者同様であろうと考えられる。

また、別報<sup>1), 2)</sup>、本報ともに G-actin に対しそれぞれ微量の M-A、M-B を加えているが、別報の成績ではむしろ本報より少なく (1/32 量) M-A を加えているにもかかわらず、なお、『濃度と無関係の域』にあり、『濃度に依存する域』に達しないが、それと同蛋白量の M-B では Fig. 3 に示す如く『濃度に依存する域』にかかっている。この点は一応注目を要する。しかし、この点について考察するに、先ず、別報<sup>2)</sup> の 1/32 量の M-A を stoichiometric ratio 1 : 5 として同量の M-A を含む M-B に換算すると 1/26.7

\* myosin-B (M-B) に存在する  $Mg^{++}$  は 0.03 r/mg である<sup>9)</sup>。従つて、Fig. 3, curve ② の条件では  $4.2 \times 10^{-8} M$  となる。

となる (stoichiometric ratio 1:3 とすると 1/25)。この量は図に見る如く、なお、『濃度と無関係の域』の部分に相当する。即ち、別報、本報についての差は M-A について比較すると良く一致を示しているといえる。従つて、このことも M-B (AM) と M-A との catalytic effect は本質的に同一であることを示すと考えられる。

最後に Fig. 1, 3 に見る如く M-B を加えた場合には、M-A の場合に比しその粘度—時間曲線の立上りがやや早いにもかかわらず最高並びに最終粘度値が低い。このような差異を生じた理由について考察を加えて見よう。

G-actin に対し M-A を加えた場合： 先ず G-F 変形が M-A の catalytic effect によつて促進される。しかし、反応過程の極く初期では G-actin 分子が大部分を占めているので比較的粘度値が低い。やがて、反応が進み生じた F-actin が増加して来るに従つて AM が次第に形成されて来る。その場合には M-A の効果の他に生じた AM の catalytic effect も関与する。しかして、粘度的には AM の形成、さらに重合して生じた F-actin の著明な network の形成によつて急速に粘度が高くなる。

G-actin に対し M-B を加えた場合： G-actin の重合に対し反応の当初から反応の最終まで AM としての catalytic effect が効くだけである。しかして、それを粘度的に考えると AM 形成はないから構造粘性が少ない。従つて、最高並びに最終粘度値が比較的低い level に留まるものであろう。

以上 2 項目に分つて actin 重合に及ぼす myosin-B (M-B) の catalytic effect につき種々考察を行つて来たが、M-B は G-actin の重合に対しほぼ M-A と同様に catalytic effect を示すことが明らかになった。しかして、このような M-B 添加によつて招来される効果は M-B sample 中に混在する free M-A 或はその他の夾雑物に基づくものでなく M-B 自体に何等かの catalytic effect があると考えねばならない。しかしながら、この catalytic effect の機構は本成績のみから説明することは困難で今後の研究に俟たねばならない。しかして、catalytic effect を持つ M-B (AM) の部位については AM の結合部でなく M-A 部分であると考えられる。

## 摘 要

- 1) 0.4 M KCl 環境において myosin-B は G-actin 重合に対し catalytic effect を示す。
- 2) F-actin は G-actin の重合に対し catalytic effect を有しない。
- 3) この catalytic effect は myosin-B が極く微量の場合にはその濃度に依存する。
- 4) かかる myosin-B の効果は myosin-B (actomyosin) 自体の作用であり、また myosin-B sample 中の無機塩その他の夾雑物或は free myosin の作用でないと考えられる。
- 5) myosin-B (actomyosin) の catalytic effect は actomyosin の結合部にはなく、それ以外の myosin 部分にあると考えられる。

(昭和 31. 12. 28 受付)

## 文 献

- 1) 遠藤邦夫：札幌医誌 9, 162 (1956).
- 2) 遠藤邦夫：札幌医誌 10, 118 (1956).
- 3) Szent-Györgyi, A.: Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle (New York, 1953).
- 4) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction (New York, 1947).
- 5) Edsall, J. T.: J. Biol. Chem. 133, 397 (1940).
- 6) Laki, K. & Clark, A.: Arch. Biochem. 30, 187 (1951).
- 7) 永井寅男：筋収縮の物理化学 (1956).
- 8) Baily, K.: Nature 157, 368 (1946).
- 9) 尾崎精一：未発表。
- 10) Straub, F. B.: Stud. Szeged. 3, 38 (1943).
- 11) Spicer, S. S. & Gergely, I.: J. Biol. Chem. 188, 179 (1951).
- 12) Mihályi, E. & Szent-Györgyi, A. G.: J. Biol. Chem. 201, 189 (1953).
- 13) Csápo, A.: Am. J. Physiol. 160, 46 (1950).
- 14) Jaisle, F.: Biochem. Z. 321, 451 (1951).